

酸素電極を用いた一般細菌数の簡易計測

～ 環境試料の測定条件とその適用性 ～

大阪工業大学大学院 学生会員 ○分林 静人 須田 充

大阪工業大学工学部 正 会 員 笠原 伸介 石川 宗孝

1.はじめに・・・水道法・水質汚濁防止法には、水系伝染病の防止などを目的に、細菌数に関する水質基準が設けられている。従来より、一般細菌数の計測には、寒天培地法¹⁾が用いられているが、作業が煩雑であること、長時間の培養を要することなどの理由から、その簡易・迅速化が望まれている。

本研究では、食品衛生管理の分野で開発された、酸素電極を用いて微生物の呼吸による試料中の溶存酸素の消費時間から容易に細菌数を推定する手法²⁾(以下、酸素電極法)を取り上げ、環境試料中の細菌計測に応用する際の測定条件および適用性について検討した。

2.測定原理・・・酸素電極法では、図-1に示す剥き出しの電極が底部に装着されたセル内に、試料および液体培地(2倍に濃縮)がそれぞれ100 μ lずつ注入され、一定の温度で培養が行われる。その際、図-2に示すように、溶液中の電極反応により溶存酸素に比例して電流が流れ、増殖する細菌の呼吸に伴う溶存酸素の挙動が電流値として検出される。溶存酸素が急激に低下し、ほぼゼロとなる時間(以下、検出時間)と、セル注入時における菌体濃度との間には良好な比例関係が成立する。これらの特性を利用し、適切な培養条件を設定することで、検出時間から試料中の細菌数を推定することができる。

3.試料の調整方法・・・純粋培養試料として *E.coli* (ATCC25922)を、環境試料として菅原城北大橋と豊里大橋の中間付近において採取した淀川表流水(以下、河川水)および塩素処理前の農業集落排水処理水(以下、排水)をそれぞれ用いた。試料は、リン酸緩衝希釈水¹⁾で適宜希釈し測定に供した。液体培地の組成は、標準寒天培地、PGY培地およびR2A培地¹⁾と同一とした。装置は恒温器内に設置し、培養温度を36, 30, 25, 20 に設定した。

4.測定条件の検討・・・表-1に、各種液体培地、培養時間で河川水を測定した際の検出時間を示す。まず、培養温度による検出時間への影響に注目すると、培養温度36, 30, 25, 20 において、検出時間はそれぞれ約6, 7, 10,

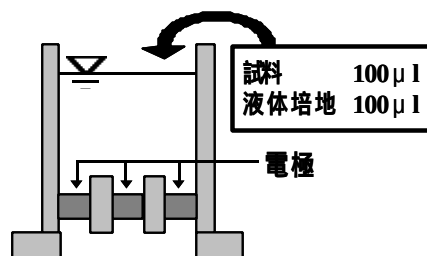


図-1 酸素電極セル概要

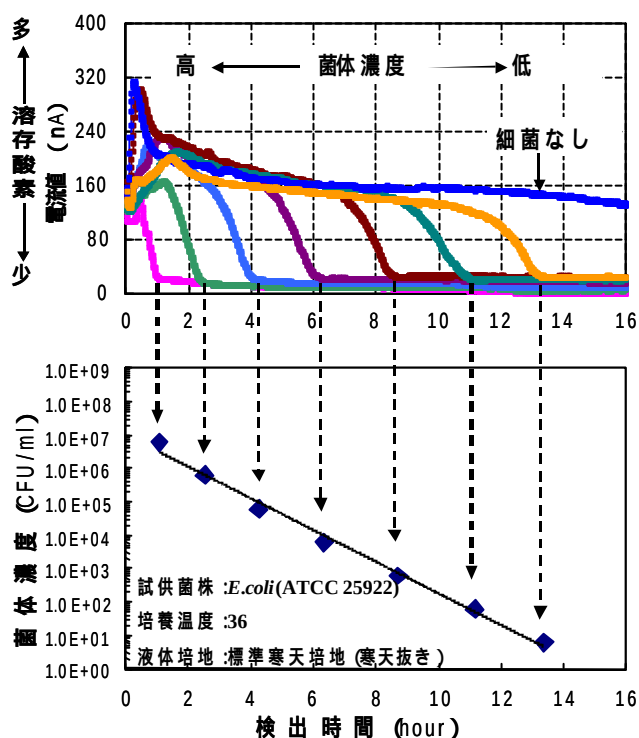


図-2 酸素電極法の原理

表-1 河川水の検出時間(4点平均値)

培養温度	液体培地の種類		
	標準	PGY	R2A
36	6.1	6.0	6.0
30	7.0	7.1	7.3
25	10.2	10.0	10.3
20	14.3	14.2	14.5

単位: hour

キーワード: 酸素電極, 簡易計測, 一般細菌, 環境試料, *E.coli*

連絡先: 〒535-8585 大阪市旭区大宮 5-16-1 大阪工業大学工学部都市デザイン工学科 Tel06-6954-4171

14 時間となり、培養温度が高いほど検出時間が短くなる傾向が認められた。また、液体培地の種類による検出時間への影響に注目すると、培養温度が等しい場合には、液体培地が異なっても検出時間にほとんど違いが認められなかった。これらの結果をふまえ、検出時間を極力短縮すべきとの観点から、酸素電極法の測定条件は、公定法¹⁾に準じ、培養温度として 36℃、液体培地として標準寒天培地(寒天抜き)をそれぞれ採用することとした。

5. 環境試料を用いた細菌計測・・・図-3 に、河川水および排水中の一般細菌数と検出時間との関係を示す。これによると、いずれの試料においても両者の間には高い相関が認められた。ここで、同じ菌体濃度における検出時間を比較すると、河川水は排水に比べて約 20% 短く、試料毎の細菌相による細菌数当たりの酸素消費速度の違いが、検出時間の差として現れることが示唆された。したがって、実際の適用に際しては、測定対象とする試料毎に検量線を作成し、この影響を極力少なくすることが必要と考えられる。

6. 測定精度の検討・・・図-4 に、*E. coli* および河川水を用いて、同一の試料を多数同時に測定した際の一般細菌数と検出時間との関係を示す。これらによると、いずれの試料においても、菌体濃度が低いほど分散が大きくなる傾向が認められ、特に、河川水では *E. coli* よりその傾向が顕著に現れることがわかった。本来、酸素電極法では、試料注入時における細菌数の微小な差が、測定に長時間を要する低濃度試料ほど検出時間に大きく影響すると考えられるが、加えて、増殖速度や呼吸活性の異なる細菌が共存する河川水では、純粋培養試料である *E. coli* とは異なり、一般細菌として検出される細菌の全てが、溶存酸素の消費に対し同様に寄与するとは限らない。このことが環境試料を測定した場合に分散がさらに大きくなった要因と考えられる。本実験では、一般細菌数が 10^3 を下回ると分散範囲が 1 オーダー以上となり、信頼性の高い結果が得られないことがわかった。

7. おわりに・・・本研究では、酸素電極法による環境試料中の一般細菌数を計測する際の測定条件を示すとともに、環境試料に対して同手法を適用した場合の問題点について指摘した。今後は、測定精度の向上および検出時間の短縮を図るため、一般細菌数が 10^3 を下回る低濃度試料に対する測定手法として、ろ過により細菌を捕集する濃縮操作および測定試料の容量増加について検討していく予定である。

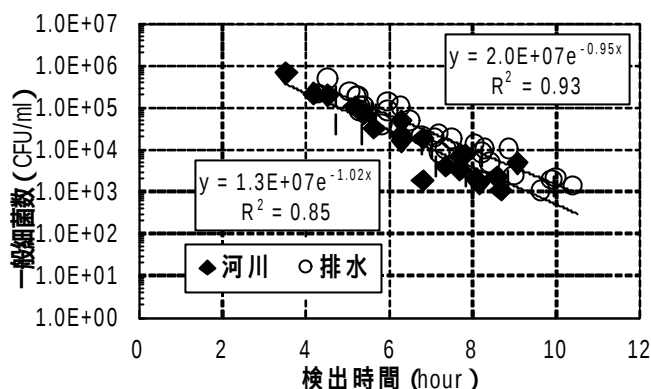


図-3 一般細菌数と検出時間の関係

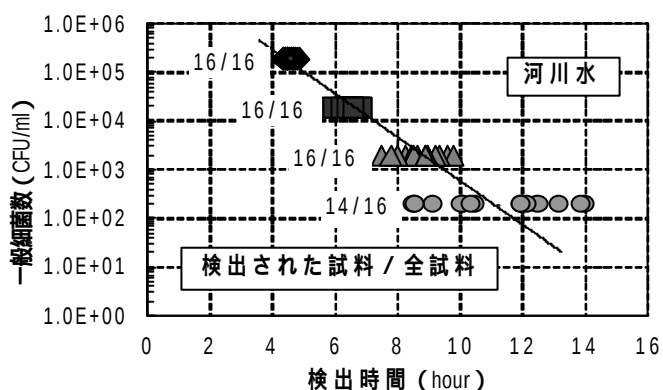
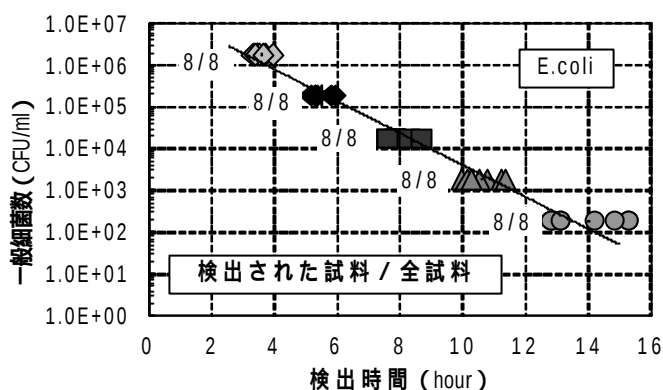


図-4 検出時間の分散

最後に、本研究の遂行に多大なご協力を頂いた(株)ダイキン環境研究所の関係各位ならびに本学卒業生の甲本周司君に感謝の意を表します。

【参考文献】

- 1) 厚生省生活衛生局水道環境部 監修：上水試験方法(1993)，(社)日本水道協会，1995.3
- 2) 酸素電極を用いた一般細菌数検査の簡易迅速化：天野義久 他，日本食品化学工学会誌，Vol.48，No.2，pp.94 - 98，2001.2